

自体 PRP 治疗兔长管状骨缺损的实验研究

陈植¹ 徐芳露² 瞿晓宏¹ 陈兵乾^{1*}

1. 常熟市第一人民医院骨科 江苏 常熟 215500
2. 常熟市第二人民医院肾内科 江苏 常熟 215500

【摘要】目的: 进行自体富血小板血浆 (platelet rich plasma, PRP) 治疗兔长管状骨缺损的实验。方法: 清洁级成年新西兰大白兔 32 只, 在双侧前臂桡侧沿桡骨截除 1.5cm 骨段 (包括骨膜), 用石蜡封闭骨断端髓腔, 制成骨不连模型, 采用自身对照法, 规定实验兔的左侧桡骨作为实验侧, 右侧桡骨为对照侧 (不做处理)。将实验兔随机分两组, 每组各 16 只, 分别命名为 PRP- 植骨组 (实验侧采取植骨治疗 +PRP 治疗) 和单纯植骨组 (实验侧采取植骨治疗)。观察各组骨不连愈合情况。结果: Micro-CT、X 线片、大体观察、组织学及生物力学等结果显示, PRP- 植骨组骨不连愈合速度明显较植骨组更快, PRP- 植骨组术后第 2 周、4 周、8 周、12 周破坏时的最大载荷 (Pm) 及破坏弯矩 (M) 均高于同时植骨组、对照侧 ($P < 0.05$)。结论: 自体 PRP 治疗兔长管状骨缺损利于骨缺损愈合, 具有深入研究价值。

【关键词】兔; 长管状骨缺损; 自体 PRP; 生物力学

Experimental Study on Long Tubular Bone Defect in Rabbits

Zhi Chen¹ Fanglu Xu² Xiaohong Qu¹ Bingqian Chen^{1*}

- 1.Changshu First People's Hospital Department of Orthopedics Jiangsu Changshu 215500
- 2.Department of Nephrology, Changshu Second People's Hospital Jiangsu Changshu 215500

Abstract: Objective: To conduct an experiment on the treatment of long tubular bone defects in rabbits with autologous platelet rich plasma (PRP). Method: 32 clean grade adult New Zealand white rabbits were used. A 1.5cm bone segment (including periosteum) was cut along the radius of both forearms, and the bone marrow cavity at the broken end was sealed with paraffin to create a bone non union model. The self control method was used, and the left radius of the experimental rabbit was designated as the experimental side and the right radius as the control side (without treatment). Randomly divide the experimental rabbits into two groups, each with 16 rabbits, and name them the PRP bone graft group (experimental side treated with bone graft+PRP treatment) and the simple bone graft group (experimental side treated with bone graft). Observe the healing of bone non union in each group. The results of Micro-CT, X-ray, gross observation, histology, and biomechanics showed that the healing speed of bone non union in the PRP bone graft group was significantly faster than that in the bone graft group. The maximum load (Pm) and bending moment (M) at 2, 4, 8, and 12 weeks after surgery in the PRP bone graft group were higher than those in the same time bone graft group and control side ($P < 0.05$). Conclusion: Autologous PRP treatment for long tubular bone defects in rabbits is beneficial for bone defect healing and has in-depth research value.

Keywords: Rabbit; Long tubular bone defect; Autologous PRP; Biomechanics

长管状骨缺损在临床上发病率较高, 此病病因包括感染性骨髓炎清创、外伤、骨不连清创、先天性骨缺损等, 发病病理机制复杂^[1-2]。骨不连清创是导致长管状骨缺损常见原因, 治疗中需要恢复骨组织, 改善骨不连情况, 以修复缺损。目前长管状骨缺损治疗上, 自体骨植入治疗可修复骨缺损, 但该种方式在修复缺损面积较大患者方面, 很难达到骨愈合, 骨不连情况突出。有研究表明, 骨折愈合过程中, 血小板可释放多种生长因子, 激活间充质细胞、触发血管生成、促进成骨细胞和软骨细胞的增殖和趋化, 将其应用在骨缺损治疗之中有促进骨愈合作用^[3]。国内外均已有多报道使用 PRP 复合自体或异体骨移植用于治疗骨不连的研究, 但国内起步相对较晚^[4]。目前尚未检索到应用自体 PRP 联合自体骨移植治疗非感染性四肢长管状骨不连的相关实验研究, 基于此, 本次研究进行自体 PRP 治疗兔长管状骨缺损的实验。

1 一般资料与方法

1.1 一般资料

清洁级成年新西兰大白兔 32 只, 体质量 2.5-3.0kg, 雌雄不限为实验对象, 在双侧前臂桡侧沿桡骨截除 1.5cm 骨段 (包括骨膜), 用石蜡封闭骨断端髓腔, 制成骨不连模型, 采用自身对照法, 规定实验兔的左侧桡骨作为实验侧, 右侧桡骨为对照侧。将 32 只实验兔随机分为两组, 每组各 16 只, 分别命名为 PRP- 植骨组和单纯植骨组。

1.2 实验方法

1.2.1 材料

(1) 实验仪器: 离心机 (Leica 公司, 德国)、硬组织切片机 (Leica 公司, 德国)、光学正置显微镜 (Carl Zeiss 公司, 德国) 等。

(2) 实验试剂、耗材: 10ml 离心管 (苏州大学材料供应中心)、2ml/10ml 注射器 (苏州大学材料供应中心)、

组织包埋盒(江苏世泰实验器材有限公司)、硅烷化粘附载玻片/盖玻片(江苏世泰实验器材有限公司)等。

1.2.2 实验流程

(1) 制备骨不连动物模型: 对实验兔进行腹腔注射麻醉, 取俯卧位, 常规消毒铺巾, 在双侧前臂桡侧沿桡骨作一2.5 cm长切口, 桡骨显露, 在距桡骨远端2cm处截骨(此处为骨隆起处), 再向近端距第一截骨线1.5cm处做第2个截骨线, 去除截除的1.5cm骨段(包括骨膜), 骨断端用石蜡封闭髓腔, 彻底止血, 依次缝合各层。10周后拍摄X线片确认骨不连模型的成功制备。

(2) 自体PRP制备: 以Landesberg法制备PRP。

(3) 手术方法: PRP-植骨组: 将实验兔按前述麻醉方法麻醉后, 常规消毒铺巾, 在兔髌骨处作一小切口, 凿取少量松质骨包于湿纱布中备用。在实验侧沿原切口切开皮肤, 暴露桡骨骨不连处, 去除断端硬化组织, 打通髓腔后, 将取下的自体松质骨植于骨不连处, 并将PRP凝胶填充于植骨处, 然后逐层缝合切口。单纯植骨组: 手术步骤同PRP-植骨组, 但术中仅将自体松质骨植于骨不连处, 不做PRP填充。

1.3 观察指标

分别在术后第2周、4周、8周、12周观察。

1.3.1 大体形态观察: 取桡骨标本, 大体观察。

1.3.2 X线片检查: X射线检查取下的桡骨标本, 观察骨不连修复情况。

1.3.3 Micro-CT检查: Micro-CT检查桡骨标本, 观察骨不连修复情况。

1.3.4 组织学观察: 按照相关规范, 进行桡骨标本处理, HE染色, 光镜下观察新骨生成情况。

1.3.5 生物力学检测: 采用拉扭双轴动静态万能材料力学试验机对骨段进行4点弯曲测试。测定内容包括, 破坏时的最大载荷(Pm)、破坏弯矩(M)。

1.4 统计方法

用SPSS 22.0软件处理所有数据, 样本的生物力学检测结果用均数表示, F检验, 差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 大体形态观察

术后2周: PPR-植骨组、植骨组植入骨和自体骨交界面出现肉芽组织桥接。

术后4周: PPR-植骨组、植骨组缺损位置可见淡红色硬纤维, 植入骨和自体骨之间可见模糊接线, 连接不牢固, 植入骨表面出现纤维骨痂, PPR-植骨组植入骨表面出现纤维骨痂多于植骨组。

术后8周: PPR-植骨组、植骨组植入骨表面出现坚硬的连续骨痂。PPR-植骨组骨痂呈膨胀性生长, 植入骨表面腔隙充填, 植入骨和自体骨结合牢固。植骨组骨痂连续, 植入骨和自体骨界限模糊, 结合不够牢固, 刀片可分离。

术后12周: PPR-植骨组缺损处骨组织覆盖完全, 愈合良好, 呈现骨性愈合。植骨组植入骨表面出现连续坚硬的骨痂, 植入骨和自体骨结合较为牢固。

对照侧骨缺损位置出现疤痕纤维结缔组织充填, 骨折硬化(截骨端)。

2.2 X线片检查

术后2周: PPR-植骨组、植骨组植入骨和自体骨交接位置清晰, 断端整齐, 断端及缺损处骨密度较对照侧高。

术后4周: PPR-植骨组缺损位置形成骨痂, 植入骨出现少量吸收。植骨组缺损位置出现少量骨痂。

术后8周: PPR-植骨组缺损位置骨痂大量形成, 覆盖植入骨, 两断端被骨痂桥接, 植入骨密度增加, 缺损位置分区模糊, 植入骨吸收明显, 骨髓腔部分出现再通。植骨组缺损位置骨痂形成增多, 覆盖大部分植入骨, 两端间隙略微模糊, 植入骨两端密度出现增加, 部分植入骨吸收。

术后12周: PPR-植骨组缺损处皮质骨新生改造基本完成, 新生骨密度接近正常骨, 植入骨基本吸收, 植入骨、自体骨连接自然, 骨髓腔基本实现再通。植骨组缺损处骨痂大量形成, 覆盖植入骨, 植入骨大部分吸收, 皮质骨基本连续, 骨髓腔部分再通。

对照侧连续型骨痂未形成, 缺损处出现骨折硬化, 骨折清晰。

2.3 Micro-CT 检查

术后2周: PPR-植骨组、植骨组植入骨、自体骨间隙明显, 材料未降解。

术后4周: PPR-植骨组材料部分降解, 正常骨质与材料间出现细小间隙, 间隙内可见骨痂。植骨组材料降解不明显。

术后8周: PPR-植骨组材料大部分降解, 正常骨质与材料附着紧密, 间隙位置出现新生类骨组织。植骨组材料部分降解, 正常骨质与材料间出现细小间隙, 骨痂充填间隙。

术后12周: PPR-植骨组材料少量未降解, 缺损位置成熟板层状骨组织充填, 胶原组织、骨细胞填充, 新生血管长入, 正常骨质、材料间接线不清, 骨缺损位置基本修复。植骨组材料大部分降解, 材料、正常骨质附着紧密, 新生类骨组织充填间隙。

对照侧未见明显变化。

2.4 组织学观察

术后2周: PPR-植骨组植入骨孔隙出现少量软骨细胞和成骨细胞, 植骨组变化不明显。

术后4周: PPR-植骨组植入骨孔隙软骨细胞和成骨细胞大量出现, 并在植入骨边缘见软骨细胞和成骨细胞, 新生骨痂表现特征为条索状, 覆盖在植入骨, 缺损两端成骨细胞更多, 形成原始骨髓腔, 载体骨内发现毛细血管新生。植骨组植入骨孔隙出现少量软骨细胞和成骨细胞。

术后8周: PPR-植骨组植入骨孔隙新生骨组织增加, 可见破骨细胞, 新生骨取代部分植入骨, 见骨髓组织, 新生骨痂(外周)成片状, 植入骨表面骨痂覆盖面积大。植骨组植入骨孔隙软骨细胞和成骨细胞大量出现, 在植入骨边缘也可见成骨细胞等。

术后12周: PPR-植骨组植入骨成熟骨组织量大, 植入骨大部分被吸收, 骨髓组织增加, 新骨、自体骨间可见骨小梁成熟。植骨组孔隙(植入骨)新生骨组织增加, 破骨细胞可见, 新生骨出现, 新生骨痂(外周)成片状, 覆盖面积扩大。

对照侧缺损位置填充大量纤维结缔组织, 骨断端髓腔封闭, 未见新骨生成。

2.5 生物力学检测

术后 2 周、4 周、8 周、12 周, Pm、破坏弯矩 M 均有 (P < 0.05), 详见表 1。
PPR- 植骨组 > 植骨组 > 对照侧, 差异有统计学意义 (P <

表 1 生物力学检测 ($\bar{x} \pm s$)

组别	术后 Pm (N)				术后 M (N·m)			
	2 周	4 周	8 周	12 周	2 周	4 周	8 周	12 周
PPR- 植骨组 (n=16)	60.15±11.23	90.35±3.67	128.06±2.03	141.35±1.25	0.014±0.001	0.021±0.001	0.034±0.004	0.041±0.006
植骨组(n=16)	40.88±15.36	64.05±3.52	92.60±1.12	101.05±1.13	0.008±0.001	0.011±0.001	0.020±0.003	0.032±0.003
对照侧(n=32)	20.80±12.56	22.13±10.25	23.54±1.71	22.81±1.56	0.005±0.001	0.008±0.001	0.008±0.002	0.008±0.002
F 值	50.528	452.349	23252.858	43381.294	432.000	912.000	448.882	520.829
P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

3 讨论

长管状骨缺损发生率高, 在其治疗中, 改善骨不连 (又称骨不愈合) 是加速患者骨修复重点。即使在手术内固定治疗如此发达如今, 长骨骨折骨不连的发生率仍非常高, 达到 5%-10%^[5]。临床上, 可以通过 X 线片、CT 等检查观察骨缺损病灶具体情况, 骨不连表现为骨折端互相分离, 骨端硬化, 间隙较大, 萎缩疏松, 髓腔封闭等征象。骨不连不仅是长管状骨缺损治疗重点, 而且骨不连治疗难度大。

近年来, 随着医学技术发展, 骨不连治疗技术有所发展, 但依旧治疗效果有限。众多手术治疗方法中, 自体松质骨移植术被认为是治疗骨不连的“金标准”。自体松质骨移植术治疗, 虽然可以起到一定修复作用, 但单纯采用植骨治疗术后恢复时间长。自体 PRP 是通过离心的方法从全血中提取出的血液制品, 含有丰富的生长因子和高浓度的血小板^[6]。PRP 血小板经活化后可释放出生长因子、转化生长因子-β、胰岛素样生长因子、血管内皮生长因子以及表皮生长因子等多种生长因子, 促进软骨组织、骨组织修复, 加速骨不连患者骨组织修复。本次研究结果显示 PPR-植骨组骨不连愈合速度明显较植骨组更快, PPR-植骨组术后第 2 周、4 周、8 周、12 周破坏时的最大载荷 (Pm) 及破坏弯矩 (M) 均高于同时植骨组、对照侧 (P < 0.05)。分析原因: PRP 血小板经活化后释放的生长因子, 可以加速基质干细胞分化, 促进成骨细胞和成纤维细胞的增殖, 加快纤维蛋白与细胞外基质的合成^[7-8]。PRP 中含有高浓度白细胞, 在控制感染方面具有积极意义。且由于 PRP 源于自体, 制作过程简单, 无需考量免疫排斥, 治疗安全性较高。

综上所述, 兔长管状骨缺损治疗中, 可以在常规植骨治疗基础上, 配合采取自体 PRP 治疗, 加速骨缺损愈合, 可深入研究。

参考文献:

- [1] 甘文奕, 谢肇, 余国荣, 等. 膜诱导结合自体干细胞移植治疗儿童股骨骨缺损 1 例 [J]. 中国矫形外科杂志, 2022,30(6):574-576.
 - [2] 梁庆优, 邓春林. 长骨大段骨缺损修复材料的力学性能及制备策略 [J]. 材料导报, 2021,35(13):13100-13108, 13118-13118.
 - [3] 谭洛卿, 何锦安, 李胜松. PRP 与 ESW 联合治疗下肢长管状骨非感染性骨不连的研究 [J]. 中国实用医药, 2021,16(19):122-124.
 - [4] 张桂红, 蔡树鹏. 3D 打印金属微孔支架填充 PRP 搭载 ADSCs 修复大节段骨缺损的护理措施 [J]. 中国医药科学, 2022,12(2):98-100,120-120.
 - [5] 都吉秀, 陈琰, 曾文娟. 富血小板纤维蛋白在自体牙即刻移植中修复重建骨缺损的效果 [J]. 实用临床医学, 2021,22(4):53-55,58-58.
 - [6] 冯卫华. 富血小板血浆技术结合同种异体骨移植对胫骨骨髓炎伴长段骨缺损患者骨代谢及生长细胞因子含量的影响 [J]. 反射疗法与康复医学, 2021,2(10):66-69.
 - [7] 张鹏臻, 李谊, 胡浩磊. 富血小板血浆对促进鼻骨缺损模型兔骨愈合的影响 [J]. 中国临床研究, 2021,34(7):900-904.
 - [8] 吴情, 王慧慧, 华洪飞, 等. 自体骨联合富血小板纤维蛋白用于埋伏阻生第三磨牙拔除后下颌第二磨牙远中骨缺损修复的随机对照研究 [J]. 口腔颌面外科杂志, 2022,32(2):100-105.
- 课题基金:
2020 年常熟市卫生健康委员会资助性青年项目, cswsq202003, 《以二次离心法制备的自体富血小板血浆联合自体骨移植治疗非感染性骨不连的实验研究》